

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پیراپزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون

عنوان:

بررسی اثر میکروپارتيكل‌های مشتق از پلاکت بر ژن‌های دخیل در تکثیر و طول عمر
سلولهای بنیادی مزانشیمی جدا شده از بند ناف

توسط: مریم ثمره صلواتی پور

استاد راهنما: دکتر روح الله میرزائی خلیل آبادی

اساتید مشاور: دکتر علیرضا فارسی نژاد، دکتر احمد فاطمی

سال تحصیلی: ۹۶-۹۷

کد پایان نامه: ۱۱۰



Kerman University Of Medical Sciences

Faculty Of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree(PhD/MSc)

Title:

**Investigation the effect of Platelet-microparticles on genes involved in
proliferation and survival of umbilical-cord derived mesenchymal stem
cells**

By:

Maryam Samareh Salavati Pour

Supervisors:

Dr.Roohollah Mirzaee Khalilabadi

Advisors:

Dr.Alireza Farsinejad

Dr.Ahmad Fatemi

Year: 2018



زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدلیل داشتن خاصیت خود نوسازی و تمایز به بافت‌های گوناگون، امروزه در بالین و تحقیقات بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. اما طول عمر محدود آنها در محیط آزمایشگاه که تنها پس از چند تقسیم سلولی رخ می‌دهد، سبب تغییراتی در این سلول‌ها می‌شود که تمام ویژگی‌های آنها را تحت الشعاع قرار داده و کاربرد آنها را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد. در این مطالعه میکروپارتیکل‌های مشتق از پلاکت، به عنوان منبعی غنی از فاکتورهای رشد، پروتئین، آنزیم و microRNA انتخاب و اثر آنها بر سرعت تکثیر و همچنین بیان ژن‌های P53 و P21، P16، c-MYC، hTERT به عنوان عوامل مهم دخیل در روند پیری و طول عمر سلول بررسی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت کشت اولیه از بند ناف جداسازی شدند. بررسی مرفولوژی آنها با میکروسکوپ معکوس و نیز بررسی آنتی ژن‌های سطحی با روش فلوسایتومتری، برای تایید مزانشیمی بودن آنها انجام گرفت. از طرفی با سانتریفیوژ کیسه‌های پلاکت تاریخ انقضا گذشته در دوره‌های مختلف، میکروپارتیکل پلاکتی تهیه و غلظت آن با روش بردفورد تعیین شد. بررسی آنتی ژن‌های خاص پلاکتی با روش فلوسایتومتری و تعیین سایز میکروپارتیکل‌های جدا شده با تکنیک DLS به منظور تایید میکروپارتیکل‌های جدا شده صورت گرفت. پس از تیمار سلولی با غلظت $50 \mu\text{g/mL}$ میکروپارتیکل پلاکتی، زمان دوبرابر شدن سلولی (PDT) در گروه تیمار با گروه کنترل مورد مطالعه قرار گرفت و سپس استخراج RNA، سنتز cDNA و بیان ژن‌های دخیل در طول عمر و تکثیر و مرگ سلول (h-TERT, c-MYC, P16, P53, P21)، با تکنیک Real-Time PCR بعد از پنج روز، ۱ ماه و نیز بعد از فریز دو ماهه انجام گرفت.

یافته‌ها: سلول‌های فیبروبلاست شکل از قطعات بندناف خارج شدند و بررسی مرفولوژی سلول‌ها و نیز مارکرهای سطحی آنها، مزانشیمی بودن آنها را تایید کرد. از طرفی تعیین سایز و بررسی مارکرهای سطحی میکروپارتیکل‌ها نشان داد که جداسازی میکروپارتیکل‌ها به درستی انجام شده بود. بررسی PDT در گروه سلولی تیمار و کنترل حاکی از کوتاه‌تر بودن این زمان در سلول‌های تیمار شده بود. نتایج Real-Time PCR هم حاکی از افزایش بیان ژن hTERT ، c-MYC کاهش بیان ژن‌های P16، P21 و P53 در گروه تیمار نسبت به کنترل در همه‌ی زمان‌های گفته شده بود.

نتیجه گیری: با گسترش مطالعات در این زمینه، احتمال می رود که میکروپارتیکل‌های پلاکتی، به عنوان روشی مناسب، ایمن و بصره در افزایش طول عمر سلول‌های بنیادی مزانشیمی شناخته شوند.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی، میکروپارتیکل پلاکتی، طول عمر، ژن h-TERT، c-MYC، P16، P21

Abstract:

Background and purpose: Mesenchymal stem cells have been widely considered in clinical researches because of their self-renewal ability and differentiation into various tissues. Nevertheless, their limited in vitro life span, which occurs only after several divisions, makes some changes in these cells, which affects all of their characteristics and remarkably reduces their applications. In this study, the effect of platelet-derived microparticles, a rich source of growth factors, proteins, enzymes and microRNAs, was evaluated on the population doubling time (PDT) as well as expression of hTERT, c-MYC, P16, P53, P21, some of the main genes, involved in aging processes and cell longevity.

Materials and methods: MSCs were isolated from umbilical cord and confirmed by evaluating their morphology and surface markers using inverted microscope and flow cytometry, respectively. Platelet microparticles were prepared by centrifuging platelet bags at different speeds, and their concentration was determined by Bradford assay. In order to confirm PMPs, DLS technique and flowcytometry were used for determining the size of PMPs and their immunophenotype. When confluency of cultured MSCs was 30%, the cells were treated with 50 µg/mL of microparticles. Then, PDT was measured in both treated and control groups. Finally, quantitative gene expression of hTERT, c-MYC, P16, P53 and P21 was performed by real-time PCR in different times (after 5 days, after 1 month and after defreeze).

Results: The fibroblast-like cells were isolated from umbilical cord particles, and their mesenchymal features were approved by their morphology and surface antigens. In addition, DLS technique and flowcytometry confirmed isolation of PMPs. The results showed that the treated group had shorter PDT compared to control group and the results of Real-Time PCR, showed that PMPs increased the expression of hTERT and c-MYC genes and also decreased the expression of P16, P21 and P53 genes in all 3 times.

Conclusion: It can be concluded that platelet-derived microparticles can potentially be recognized as a suitable, safe and effective method in increasing the life span of umbilical-cord mesenchymal stem cells; however, further investigations are needed.

تاریخ ۹۷/۲/۵

شماره ۵۲۴

پیوست

بسمه تعالی



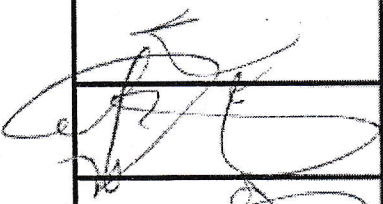
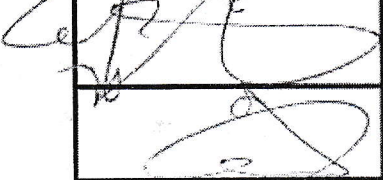

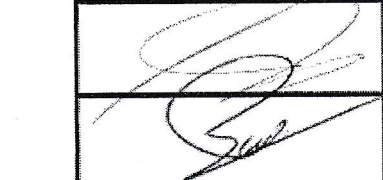

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تحصیلات تکمیلی دانشگاه

صور تجلسه دفاع از پایان نامه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی خانم مریم ثمره صلواتی پور دانشجوی کارشناسی ارشد رشته خون شناسی و بانک خون دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان بررسی اثر میکروپارتنیکل های مشتق از پلاکت بر بیان ژن های دخیل در تکثیر و طول عمر سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف

در ساعت ۱۲ روز چهارشنبه مورخ ۹۷/۲/۵ با حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف: استاد(ان) راهنما	دکتر روح اله میرزایی	
ب: استاد(ان) مشاور	دکتر علیرضا فارسی نژاد دکتر احمد فاطمی	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	دکتر غلامحسین حسن شاهی	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	دکتر محسن بصیری	
ه: نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر مهدی زمانلو	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه عالی و نمره ۲۰/۱ مورد تایید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی

